



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 095 409** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК<sup>6</sup> **C 12 N 1/20, 3/00, A 61 K**

**39/07/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:07)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 95111037/13, 27.06.1995

(46) Дата публикации: 10.11.1997

(56) Ссылки: 1. 1. SU, авторское свидетельство, 1837071, кл.С 12N 1/20, 1993. 2. SU, авторское свидетельство, 1791449, кл.С 12N 3/00, 1993.

(71) Заявитель:

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

(72) Изобретатель: Гаврилов В.А.,  
Числов Ю.В., Николайчук Л.Ф.

(73) Патентообладатель:

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

**(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ**

(57) Реферат:

Использование: биотехнология, микробиология, вакцина против сибирской язвы животных. Сущность изобретения: культивирование вакцинного штамма 5-ВНИИВВиМ осуществляют в жидкой споруляционно-ростовой среде, содержащей дрожжевой экстракт, пептон, калий фосфорнокислый двузамещенный, кальций хлористый, цинк сернокислый, медь сернокислую, железо сернокислое, аммоний сернокислый и воду (рН 7,2±0,2). При этом

культивирование штамма осуществляют в реакторе в течение 23 - 25 ч, из них первые 17 - 19 ч при аэрации, поддерживая скорость растворения кислорода в среде 5,5 ± 0,2 ммоль на 1 л среды в час. Для концентрирования спор используют натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, которую вносят в суспензию до концентрации 0,2 - 0,3%, а отстаивание осуществляют при температуре 0 - 25°C в течение 23 - 25 ч. 2 з.п. ф-лы.

RU 2 095 409 C1

RU 2 095 409 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 095 409** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 N 1/20, 3/00, A 61 K**  
**39/07/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:07)**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95111037/13, 27.06.1995

(46) Date of publication: 10.11.1997

(71) Applicant:  
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij  
institut veterinarnoj virusologii i mikrobiologii

(72) Inventor: Gavrilov V.A.,  
Chislov Ju.V., Nikolajchuk L.F.

(73) Proprietor:  
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij  
institut veterinarnoj virusologii i mikrobiologii

(54) **METHOD OF PREPARING VACCINE FOR CONTROL OF ANTHRAX IN ANIMALS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology.  
SUBSTANCE: culturing of vaccine strain 55-BHIIBBiM is carried out on liquid sporulation-growing medium containing yeast extract, peptone, potassium hydrogen phosphate, calcium chloride, zinc sulfate, copper sulfate, iron sulfate, ammonium sulfate and water ( $\text{pH} = 7.2 \pm 0.2$ ). Strain is

cultured in reactor for 23-25 h being the first 17-19 h under aeration maintaining the rate of oxygen dissolving in medium  $5.5 \pm 0.2$  mM/h. Carboxymethylcellulose sodium salt is used for spore concentrating that is added to suspension up to concentration 0.2-0.3%. Settling is carried out for 23-25 h at 0-25 C. EFFECT: improved method of vaccine preparing. 3 cl

RU 2 095 409 C1

RU 2 095 409 C1

Изобретение относится к области микробиологии, в частности к биотехнологии вакцинных препаратов, и может быть использовано при изготовлении вакцины против сибирской язвы.

Для изготовления вакцины против сибирской язвы животных используют способ культивирования бактерий вида *B.anthraxis* в бутылках-четвертях на плотной питательной споруляционной среде, содержащей в качестве основного компонента гидролизат кормовых дрожжей [1]

Недостатком данного способа является длительность процесса культивирования штамма *B. anthracis* (72 82 ч), а также трудоемкость, так как наработка спорового материала производится в бутылках-четвертях.

Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, является способ культивирования штамма 55-ВНИИВВиМ в жидкой питательной среде с использованием в качестве источника азота кислотного гидролизата говяжьего мяса. Способ позволяет за 48 ч получить споровый материал, содержащий 100 300 млн. жизнеспособных спор штамма 55-ВНИИВВиМ [2]

Основные недостатки этого способа заключаются в небольшом выходе спорового материала с 1 см<sup>3</sup> питательной среды (100 300 млн. спор в 1 см<sup>3</sup>), в использовании в среде культивирования мяса, ценного продукта питания человека, а также в длительности процесса выращивания культуры и получения спор (2 сут).

Известен способ концентрирования бактериальных спор отстаиванием с использованием вспомогательного вещества полиэтиленimina (авт.св. N 1792969, кл. С 12 N 1/02, авторы Бакулов И.А и др.). Он позволяет проводить концентрирование бактериальных спор в суспензии за 4 5 сут.

Основные недостатки этого способа заключается в длительности процесса концентрирования (4 5 сут), а также в образовании прочных конгломератов спор при отстаивании, которые трудно ресуспендировать. Наличие конгломератов спор в вакцине недопустимо.

Целью настоящего изобретения является увеличение выхода количества спор с единицы питательной среды, сокращение трудоемкости способа, материальных затрат и времени на получение и концентрирование спорового материала для изготовления вакцины.

Цель достигается тем, что в предлагаемом способе изготовления вакцины против сибирской язвы культивирование осуществляют в реакторе с использованием разработанной нами и апробированной при производстве вакцины жидкой споруляционно-ростовой среды следующего состава (мас.%):

Дрожжевой экстракт сухой 0,2 0,3  
Пептон ферментативный сухой 0,2 0,3  
Калий фосфорнокислый двузамещенный 0,04 0,06  
Кальций хлористый 0,004 0,006  
Магний сернокислый 0,03 0,05  
Цинк сернокислый 0,0005 0,0015  
Медь сернокислая 0,0005 0,0015  
Железо сернокислое 0,00005 0,00015  
Аммоний сернокислый 0,15 0,25

Вода деминерализованная (рН 7,2 ±0,2)

Остальное

Кроме того, используют иные условия культивирования. В первые 18 ч культуру штамма 55-ВНИИВВиМ аэрируют воздухом путем барботирования, уровень аэрации составляет 5,3 5,7 ммоль растворенного кислорода на 1 л среды в 1 ч, при этом 95 100% выросших бактериальных клеток образуют споры. Затем аэрирование прекращают и культуру выдерживают 6 ч до завершения спорообразования и полного лизиса вегетативного материала.

Сокращение времени на концентрирование спорового материала достигается использованием в качестве вспомогательного вещества натриевой соли: карбоксиметилцеллюлозы (Na КМЦ) в оптимальной концентрации 0,2 0,3%. Кроме того, осаждение спор осуществляют непосредственно в реакторе при температуре 0 25°C в течение 23 25 ч.

Способ культивирования разработан на 5-литровом ферментере "Бромма" (фирма ЛКБ Швеция) и воспроизведен в 250-литровом реакторе. Указанный способ может быть осуществлен в сосудах для культивирования различного объема. Для этого необходимо определить массообменные по кислороду характеристики используемых сосудов. Это можно выполнить с помощью сульфитного метода.

Пример 1. Определение массообмена по кислороду в 250-литровом реакторе, выращивание культуры штамма 55-ВНИИВВиМ и получение спор.

В 250-литровом реакторе, содержащем 160 л дистиллированной воды, по усовершенствованному сульфитному методу определяют скорость растворения кислорода (ммоль О<sub>2</sub> в час) при подаче воздуха через барботер в реакторе в количестве 2,5 дм<sup>3</sup>/л воды в мин или 40 дм<sup>3</sup>/160 л воды в мин (1-е измерение); 5 дм<sup>3</sup>/л воды в мин или 80 дм<sup>3</sup>/160 л в мин (2-е измерение) и 7,5 дм<sup>3</sup>/л воды в мин или 120 дм<sup>3</sup>/160 л воды в мин (3-е измерение).

Полученные числовые значения трех измерений используют для построения графика, отражающего зависимость уровня аэрации (ммоль О<sub>2</sub>/л в час) от скорости подачи воздуха в реактор (дм<sup>3</sup>/л в мин).

Выращивание культуры штамма 55-ВНИИВВиМ и получение спор.

В реакторе (250 л) приготавливают 160 л споруляционно-ростовой среды по прописи (см. выше). Реактивы растворяют в той же последовательности, в которой они написаны. Устанавливают рН среды 7,2±0,2 добавлением 25%-ного раствора гидроокиси калия или натрия. Среду стерилизуют при 134 °С в течение 1 ч и охлаждают до 30 35°C.

В реактор с питательной средой заливают через пробоотборник посевной материал, споровую суспензию штамма 55-ВНИИВВиМ, в количестве 1,5 - 3,0•10<sup>12</sup> жизнеспособных спор, что составляет 1 2 •10<sup>7</sup> спор на см<sup>3</sup> среды. Весь посевной материал должен содержаться в объеме 2 5 л.

Устанавливают температуру инкубирования 37 °С, в засеянную питательную среду подают сжатый воздух через барботер. Скорость подачи воздуха

определяют по графику массообмена. Она должна обеспечивать уровень аэрации 5,5 ммолей  $O_2$ /л в час. Культивируют 18 ч. Следующие 6 ч инкубируют без аэрации.

Культура вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ, выращенная в этих условиях, состоит из зрелых жизнеспособных спор, количество которых в 1 см<sup>3</sup> составляет 350 500 млн.

Повышение уровня аэрации выше 5,7 ммолей  $O_2$ /л в час отрицательно влияет на рост и спорообразование культуры штамма 55-ВНИИВВиМ: "урожай" спор с 1 см<sup>3</sup> питательной среды снижается на 30 40% спорообразование происходит лишь у 70 80% выросших вегетативных клеток.

Снижение уровня аэрации ниже 5,3 ммолей  $O_2$ /л в час вызывает резкое уменьшение процента спорообразования. Споруют лишь 50 60% вегетативных клеток. Выход спор с 1 см<sup>3</sup> питательной среды уменьшается на 45 50%.

Пример 2. Осаждение спор в культуре вакцинного сибирезвеного штамма 55-ВНИИВВиМ непосредственно в реакторе.

В реактор, содержащий 160 л споровой культуры штамма 55-ВНИИВВиМ с концентрацией спор 350 500 млн./см<sup>3</sup>, заливают через пробоотборник 16 л 2%-ного раствора Na КМЦ, простерилизованного при 121°C в течение 1 ч и охлажденного до 40 50 °С. Содержимое реактора перемешивают и оставляют в состоянии покоя на 20 24 ч. По истечении этого времени надосадов осторожно декантируют, а осадок тщательно перемешивают и сливают в отдельный сосуд, например 20-литровую стеклянную бутыл. Осадок в количестве 10 15 л содержит 4 6 млрд. жизнеспособных спор/см<sup>3</sup>, легко ресуспендируется и его используют для изготовления вакцины против сибирской язвы животных. В этих условиях происходит 10-15-кратное концентрирование спорового материала.

При добавлении в споровую культуру Na КМЦ в конечной концентрации более 0,2% скорость осаждения спор не увеличивается.

При добавлении в споровую культуру Na КМЦ в количестве 0,10 0,15% осаждение спор происходит медленно в течение 10 12 сут. Изменение температуры от 0 до 25°C не влияет на скорость осаждения спор.

К суперконцентрированному споровому материалу добавляют глицерин до конечной концентрации 30%. Полученную в результате жидкую суперконцентрированную вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ с содержанием 50 300 доз в объеме 1 5 мл разливают в ампулы и отпаивают без вакуума.

Использование предлагаемого способа изготовления вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ по сравнению с существующими способами обеспечивает следующие преимущества:

позволяет изготавливать в реакторах большие объемы спор штамма 55-ВНИИВВиМ и концентрировать их, соблюдая условия стерильности;

сокращает время на изготовление спорового материала в 2 раза, а на концентрирование спор в 5 раз;

позволяет проводить концентрирование спор в широком диапазоне температуры (0 25 °С);

дает возможность увеличить выход спор с 1 см<sup>3</sup> питательной среды в 2 раза;

позволяет получать жидкую суперконцентрированную вакцину.

### Формула изобретения:

1. Способ изготовления вакцины против сибирской язвы животных, включающий культивирование штамма 55-ВНИИВВиМ в жидкой питательной среде, содержащей органический источник азота, до максимального образования спор и концентрирование споровой культуры с использованием вспомогательного вещества с последующим отстаиванием смеси и отделением осадка, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода количества спор с единицы питательной среды, сокращения трудоемкости способа, материальных затрат и времени на получение и концентрирование спорового материала, штамм 55-ВНИИВВиМ культивируют на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт сухой, пептон, калий фосфорнокислый двузамещенный, кальций хлористый, магний сернокислый, цинк сернокислый, медь сернокислую, железо сернокислое, аммоний сернокислый при следующем соотношении компонентов, мас.

Дрожжевой экстракт сухой 0,2 0,3  
Пептон ферментативный сухой 0,2 0,3  
Калий фосфорнокислый двузамещенный 0,04 0,06  
Кальций хлористый 0,004 0,006  
Магний сернокислый 0,03 0,05  
Цинк сернокислый 0,0005 0,0015  
Медь сернокислая 0,0005 0,0015  
Железо сернокислое 0,00005 0,00015  
Аммоний сернокислый 0,15 0,25  
Вода деминерализованная (pH 7,2 ± 0,2)  
) Остальное

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование осуществляют в реакторе в течение 23 25 ч, из них первые 17 19 ч при аэрации, поддерживая скорость растворения кислорода в среде (5,5 ± 0,2) ммоль на 1 л среды в час.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что для концентрирования бактериальных спор в качестве вспомогательного вещества используют натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, которую вносят в суспензию до конечной концентрации 0,2 0,3% а отстаивание проводят при 0 25°C в течение 23 25 ч.